8 月 August
2019, 62(8): 1003－1008
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2019.08.013

微小 RNA *ame-miR-31a* 和 *ame-miR-13b* 在意大利蜜蜂哺育蜂和采集蜂脑部的表达差异

刘 芳[1,*], 施腾飞[2]

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230000; 2. 安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230000)

摘要:【目的】研究微小 RNA *ame-miR-31a* 和 *ame-miR-13b* 在意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 哺育蜂和采集蜂脑部的表达情况,探索其在蜜蜂哺育蜂和采集蜂行为转变中的调节作用。【方法】利用 qPCR 分别检测 *ame-miR-31a* 和 *ame-miR-13b* 在意大利蜜蜂工蜂正常蜂群和同龄蜂群中哺育蜂和采集蜂脑部的表达量。【结果】不论在意大利蜜蜂工蜂正常蜂群中还是在同龄蜂群中,*ame-miR-31a* 在哺育蜂脑部的表达量总是显著高于其在采集蜂脑部的表达量;在正常蜂群中,*ame-miR-13b* 在采集蜂脑部的表达量显著高于其在哺育蜂脑部中的表达量;在同龄蜂群中,*ame-miR-13b* 在年老哺育蜂脑部的表达量极显著高于其在同龄采集蜂脑部的表达量,在年轻哺育蜂脑部与同龄年轻采集蜂脑部的表达量差异不显著。【结论】*ame-miR-13b* 在意大利蜜蜂哺育蜂和采集蜂脑部的表达没有明显规律,而 *ame-miR-31a* 总是在哺育蜂脑部高表达,提示 *ame-miR-31a* 在蜜蜂哺育蜂和采集蜂行为转变中可能发挥重要的调控作用。

关键词: 意大利蜜蜂; 级型分化; 劳动分工; 哺育蜂; 采集蜂; 微小 RNA; *ame-miR-31a*; *ame-miR-13b*

中图分类号: S891 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2019)08-1003-06

Expression difference of microRNAs *ame-miR-31a* and *ame-miR-13b* in brains of nurses and foragers of *Apis mellifera ligustica* (Hymenoptera: Apidae)

LIU Fang[1,*], SHI Teng-Fei[2] (1. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230000, China; 2. College of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230000, China)

Abstract:【Aim】This study aims to detect the expression differences of microRNAs *ame-miR-31a* and *ame-miR-13b* in brains of nurses and foragers of *Apis mellifera ligustica* and to explore their regulation function in the behavioral transition between nurses and foragers of honeybee.【Methods】The expression levels of *ame-miR-31a* and *ame-miR-13b* in brains of nurses and foragers from both typical colonies and single-cohort colonies of *A. m. ligustica* workers were detected by qPCR.【Results】*ame-miR-31a* showed significantly higher expression level in brains of nurses than in brains of foragers in both the typical colonies and single-cohort colonies of *A. m. ligustica* workers, while *ame-miR-13b* showed significantly higher expression level in brains of foragers than in brains of nurses in the typical colonies.

基金项目: 安徽省教育厅科研项目(KJ2018A0138); 高校省级优秀青年人才基金重点项目(2013SQRL018ZD); 地方畜禽遗传资源保护与生物育种安徽省重点实验室开放课题(AKLGRCB2017007)

作者简介: 刘芳, 女, 1985 年 11 月出生, 江西吉安人, 博士, 讲师, 主要从事蜜蜂分子生物学与蜜蜂行为学研究, E-mail: lfxiaomifeng@ahau.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: lfxiaomifeng@ahau.edu.cn

收稿日期 Received: 2019-03-12; 接受日期 Accepted: 2019-05-30

In the single-cohort colonies, *ame-miR-13b* had extremely significantly higher expression level in brains of old nurses than in brains of foragers at the same age, but showed no significant difference in the expression level between young nurses and young foragers.【Conclusion】The expression of *ame-miR-13b* shows no distinct pattern in brains of nurses and foragers of *A. m. ligustica*, while *ame-miR-31a* shows significantly higher expression level in brains of nurses, suggesting that *ame-miR-31a* may play an important role in regulating the behavioral transition between nurses and foragers.

Key words: *Apis mellifera ligustica*; caste differentiation; division of labour; nurses; foragers; microRNA; *ame-miR-31a*; *ame-miR-13b*

意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 作为真社会昆虫,一直是人类研究动物复杂行为的模式生物,而其典型的劳动分工行为更受科学家们的关注。众所周知,在正常蜂群中,成年工蜂出房一周后,主要从事巢内哺育任务(哺育蜂),大约 1 ~2 周后,它们则从事巢内清理或者食物贮存等工作,出房 3 周以后开始外出从事采粉采蜜等工作(采集蜂)(Robinson, 1992)。然而,蜜蜂这种与年龄相关的劳动分工行为受蜂群的调控,有时蜜蜂会提前采集,有时蜜蜂又会推迟从事采集行为,甚至有时年老的采集蜂会因蜂群的需要而返回巢内从事哺育工作(Robinson, 1987)。蜜蜂这种行为可塑性与其自身脑部神经结构变化、体内激素水平及脑部基因表达变化等有关(Whitfield *et al*., 2003; Weaver *et al*., 2007)。其中脑部基因的变化包括 mRNA 和微小 RNA (microRNA, miRNA)的变化。miRNA 是一类长度为 20 nt 左右的非编码单链小 RNA。成熟的 miRNA 与 RNA 诱导的沉默复核体结合,通过与位于靶基因 mRNA 3′UTR 的特定序列进行碱基配对,最终抑制 mRNA 翻译或者降解 mRNA,实现对基因的调控(Bartel, 2004)。Lee 等(1993)发现 *lin*-4 能够调控秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 幼虫发育时间,不能翻译成蛋白质,但是可以产生一对小 RNA,*lin*-4 是人类史上第一个被发现的 miRNA。随后越来越多的 miRNA 及其功能被挖掘。

2006 年,蜜蜂基因组测序结果公布(Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006),2007 年蜜蜂基因组中的 miRNA 被发现,蜜蜂领域 miRNA 的研究便推向热潮(Weaver *et al*., 2007)。目前在蜜蜂中一共有 254 个 miRNA 前体和 262 个成熟的 miRNA(http://www.mirbase.org/)。miRNA 对蜜蜂发育、行为、免疫及疾病调控方面都发挥着重要的作用(Lourenço *et al*., 2013; Nunes *et al*., 2013; Cristino *et al*., 2014; Ashby *et al*., 2016)。而 *ame-miR-31a* 和 *ame-miR-13b* 在蜜蜂中的研究报道不多。Shi 等(2015)利用高通量测序检测意大利蜜蜂蜂王和工蜂幼虫 miRNA,发现 *ame-miR-13b* 在蜂王中表达下调,但是 *ame-miR-31a* 在蜂王和工蜂幼虫中表达没有差异。接着 Macedo 等(2016)发现 *ame-miR-31a* 和 *ame-miR-13b* 在没有活性的西方蜜蜂 *Apis mellifera* 工蜂卵巢中上调表达,由此推测 *ame-miR-13b* 在蜜蜂级型分化中可能发挥重要的作用。Behura 和 Whitfield (2010)最早通过荧光定量 PCR 检测西方蜜蜂采集蜂与哺育蜂脑部 miRNA 的表达情况,发现 *ame-miR-13b* 和 *ame-miR-13a* 在哺育蜂中上调表达,推测其可能参与蜜蜂相关的行为变化。同期我们利用高通量技术检测西方蜜蜂哺育蜂和采集蜂头部 miRNA 表达谱,发现 *ame-miR-31a* 在哺育蜂中表达上调,*ame-miR-13b* 在哺育蜂中表达下调,其中 *ame-miR-31a* 和 *ame-miR-13b* 是表达差异最显著的两个基因(Liu *et al*., 2012)。

本研究通过构建意大利蜜蜂同龄蜂群,利用 qPCR 分别检测 *ame-miR-31a* 和 *ame-miR-13b* 在意大利蜜蜂哺育蜂和采集蜂脑部的表达差异情况,探索其在蜜蜂哺育蜂和采集蜂行为转变中的调节作用,为深入认识 miRNA 在蜜蜂可塑性中调控机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 蜜蜂样本采集

意大利蜜蜂工蜂哺育蜂和采集蜂来自安徽农业大学蜂业研究所种蜂场。本实验采集正在子脾上饲喂小幼虫的蜜蜂作为哺育蜂,采集刚飞回巢门口且后足携带花粉的蜜蜂作为采集蜂。从 3 个正常蜂群中分别采集哺育蜂和采集蜂,每个蜂群采集哺育蜂和采集蜂各 30 头。

将快要出房的工蜂封盖子巢脾提到恒温恒湿培养箱里培养(35℃, RH 40%, 黑暗)。次日对刚出房的工蜂用油漆进行标记(标记 1 000 头左右,本实

验将 24 h 内出房的工蜂作为 1 日龄）后关入小笼子内在培养箱里培养 2 h（30℃，RH 70%，黑暗），然后将其引入提前准备好的小蜂箱（蜂箱有 1 头正常产卵蜂王和少量哺育蜂）。本实验共组建 3 个同龄蜂群。在组建后第 7，8 和 9 天采集年轻哺育蜂（young nurses，YN）和年轻采集蜂（young foragers，YF），接着在第 28，29 和 30 天采集年老哺育蜂（old nurses，ON）和年老采集蜂（old foragers，OF）。在每个日龄阶段采集 10 头蜜蜂。采集回来的蜜蜂立即进行脑部解剖。

1.2　意大利蜜蜂脑部解剖及总 RNA 的提取

将 1.1 节采集的工蜂立即在冰上解剖获得脑部（Olivier *et al.*，2008），每个样本包含 30 个蜜蜂脑部，每个样本重复 3 次。按照 RNA 提取试剂盒 miRNeasy® Mini Kit 的试剂说明提取总 RNA，并利用 NanoDrop 检测总 RNA 浓度和质量。

1.3　茎环反转录 PCR

利用软件 Primer 5.0 设计目的基因 *ame-mir-13b* 和 *ame-mir-31a* 的引物（序列分别为 5′-tatcacagccatttttgacgatt-3′ 和 5′-ggcaagatgtcggcatagctga-3′），序列在上海生工生物工程有限公司合成。引物序列见表 1。

本实验茎环反转录 PCR 反应体系（20 μL）：1.2 节提取的总 RNA 148 ng，茎环反转录 PCR 引物（500 nmol/L）1.5 μL，dNTPs（125 μmol/L）2 μL，DL-dithiothreitol（0.01 mol/L）2 μL，SuperScript Ⅱ reverse transcriptase（200 U/μL）1 μL，RNase inhibitor（40 U）1 μL，1 × RT buffer 10 μL。反应条件：16℃ 30 min，42℃ 50 min，70℃ 15 min。反应产物在 4℃保存。

表 1　引物信息
Table 1　Information of primers

miRNA	引物序列（5′–3′） Primer sequences	用途 Purpose
ame-miR-13b	gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgcactggatacgacaatcgt	茎环反转录 Stem-loop reverse transcription
	F：tatcacagccatttttgacg R：gtgcagggtccgaggt	qPCR
ame-mir-31a	gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgcactggatacgactcagct	茎环反转录 Stem-loop reverse transcription
	F：ggcaagatgtcggcata R：gtgcagggtccgaggt	qPCR

1.4　qPCR 检测 miRNA *ame-miR-31a* 和 *ame-miR-13b* 的表达

qPCR 使用 SYBR 掺入法，以水代替模板作为一个阴性对照，以反应体系全部为水作为一个空白对照。管家基因 *β-actin*（引物序列：5′-tgccaacactgtcctttctc-3′）作为内参基因。miRNA *ame-miR-31a* 和 *ame-miR-13b* 引物序列见表 1。反应体系（20 μL）：1.3 节合成的 cDNA 1 μL，THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix 10 μL，正反向引物（0.4 μmol/L）各 0.8 μL，Distilled water 7.4 μL。采用两步法 PCR：95℃ 1 min；95℃ 15 s，60℃ 1 min，40 个循环；溶解曲线，95℃ 20 s。每次反应所有样本均技术重复 3 次。

1.5　数据分析

本实验采用比较 C_T 法计算目的基因的相对定量。首先鉴定目的基因与管家基因扩增效率相同，目的基因的表达量 = $2^{-\triangle\triangle Ct}$，△△Ct =（Ct 目的基因 – Ct 管家基因）实验组 –（Ct 目的基因 – Ct 管家基因）对照，$2^{-\triangle\triangle Ct}$表示的是实验组的基因的表达相对于对照组的变化倍数（Livak and Schmittgen，2001）。利用 SPSS16.0 软件通过 *T* 检验检测哺育蜂和采集蜂中目的基因的表达量差异显著性。

2　结果

2.1　*ame-miR-31a* 和 *ame-miR-13b* 在意大利蜜蜂正常蜂群中的哺育蜂和采集蜂脑部的表达量

在正常蜂群中，*ame-miR-31a* 在意大利蜜蜂哺育蜂脑部的表达量极显著高于其在采集蜂脑部的表达量（$t = 6.371$，$df = 5$，$P < 0.01$）（图 1：A）；*ame-miR-13b* 在采集蜂脑部的表达量极显著高于其在哺育蜂脑部中的表达量（$t = 6.419$，$df = 5$，$P < 0.01$）（图 1：B）。

2.2　*ame-miR-31a* 和 *ame-miR-13b* 在同龄蜂群中的哺育蜂和采集蜂脑部的表达量

如图 2（A）所示，在同龄蜂群中，*ame-miR-31a*

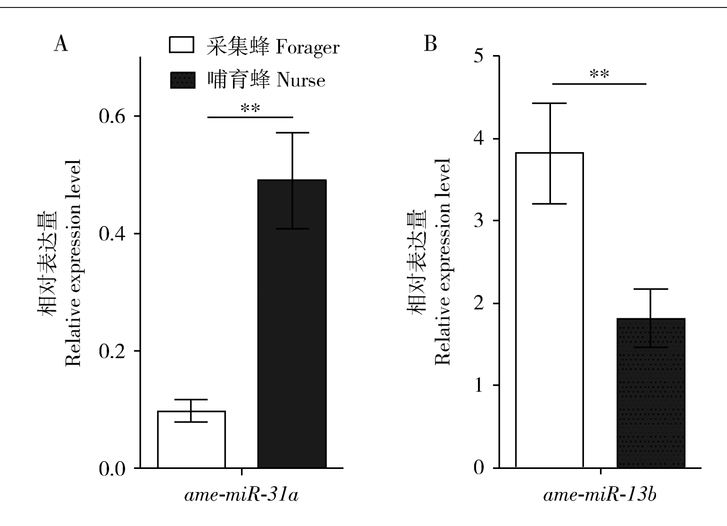


图 1 *ame-miR-31a*（A）和 *ame-miR-13b*（B）在意大利蜜蜂正常蜂群中哺育蜂和采集蜂脑部的表达量

Fig. 1 Expression levels of *ame-miR-31a* (A) and *ame-miR-13b* (B) in brains of nurses and foragers of *Apis mellifera ligustica* from typical colonies

图中数据为平均值 ± 标准误。Data in the figure are mean ± *SE*. ** 差异极显著（$P<0.01$, T 检验）Extremely significant difference ($P<0.01$, T-test).

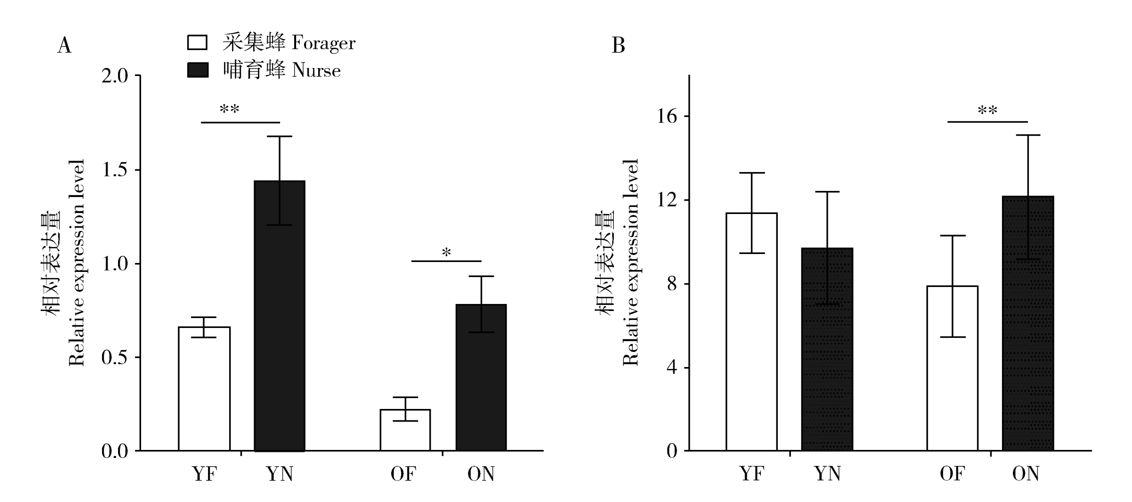


图 2 *ame-miR-31a*（A）和 *ame-miR-13b*（B）在意大利蜜蜂同龄蜂群(SCC)中哺育蜂和采集蜂脑部的表达量

Fig. 2 Expression levels of *ame-miR-31a* (A) and *ame-miR-13b* (B) in brains of nurses and foragers of *Apis mellifera ligustica* from single-cohort colonies (SCC)

本实验利用 1 日龄工蜂共组建 3 个同龄蜂群，在组建后第 7，8 和 9 天采集年轻哺育蜂（YN）和年轻采集蜂（YF），在第 28，29 和 30 天采集哺育蜂（ON）和年老采集蜂（OF）。在每个日龄阶段采集 10 头蜜蜂。图中数据为平均值 ± 标准误；星号和双星号分别示组间差异显著（$P<0.05$）和极显著（$P<0.01$）（T 检验）。Three single-cohort colonies were constructed with 1 day-old worker bees in this study. The young nurses (YN) and young foragers (YF) were collected in the next 7, 8 and 9 d after construction. Then old nurses (ON) and old foragers (OF) were collected when they were 28, 29 or 30 day-old. Ten honey bees were collected from each group of the same aged bees. Data in the figure are mean ± *SE*. The asterisk and double asterisk indicate significant difference ($P<0.05$) and extremely significant difference ($P<0.01$) between groups (T-test).

在年轻哺育蜂脑部的表达量极显著高于其在同龄采集蜂脑部的表达量（$t=4.251$, $df=8$, $P<0.01$）；*ame-miR-31a* 在年老哺育蜂脑部的表达量显著高于其在同龄采集蜂脑部的表达量（$t=2.611$, $df=5$, $P<0.05$）。*ame-miR-13b* 在同龄蜂群中年轻哺育蜂脑部的表达量稍低于其在同龄采集蜂脑部的表达量，但差异不显著（$P>0.05$）；但是 *ame-miR-13b* 在年老哺育蜂脑部的表达量则极显著高于其在同龄采集蜂脑部的表达量（$t=6.402$, $df=5$, $P<0.01$）（图 2：B）。

3 讨论

关于 miRNA 在昆虫中的功能研究报道非常多

(Behura, 2007；施腾飞等, 2014b),而 *ame-miR-13b* 和 *ame-miR-31a* 的功能研究甚少。有研究 *miR*-2 家族(*miR*-2, *miR-13a* 和 *miR-13b*)通过保幼激素信号通路调节昆虫的变态发育。*miR*-31 调节果蝇脑部神经胶质的平衡(Foo *et al.*, 2017)。*miR-31a* 可能通过调节果蝇脑部神经参与调控果蝇的记忆行为(Busto *et al.*, 2015)。前期我们通过高通量测序检测 *ame-miR-31a* 和 *ame-miR-13b* 在意大利蜜蜂正常蜂群哺育蜂和采集蜂头部的表达量差异显著(Liu *et al.*, 2012)。本研究利用 qPCR 检测 *ame-miR-31a* 和 *ame-miR-13b* 在意大利蜜蜂正常蜂群中哺育蜂和采集蜂脑部的表达情况,发现 *ame-miR-31a* 在哺育蜂脑部上调表达,而 *ame-miR-13b* 在采集蜂脑部上调表达,与之前的研究结果（施腾飞等, 2014a）一致,而与 Behura 和 Whitfield(2010)的报道的 *ame-miR-13b* 在西方蜜蜂哺育蜂脑部上调表达结果不同,这可能与蜜蜂样本来源及实验技术不同有关。但是在我们的研究基础上,可以初步说明这两个基因在蜜蜂哺育蜂和采集蜂行为转变中可能发挥重要的作用。

然而,*ame-miR-13b* 和 *ame-miR-31a* 这种表达差异是来源于蜜蜂从事不同的工作导致的还是因为蜜蜂本身不同的年龄造成的呢？为此,我们构建了意大利蜜蜂同龄蜂群,利用 qPCR 检测 *ame-miR-13b* 和 *ame-miR-31a* 在同龄蜂群中哺育蜂与采集蜂脑部的表达情况,结果发现 *ame-miR-31a* 在哺育蜂脑部的表达量总是显著高于其在同日龄采集蜂脑部的表达量,与其在正常蜂群中的表达差异情况一样；而 *ame-miR-13b* 在年老哺育蜂脑部的表达量极显著高于其在同日龄采集蜂脑部的表达量,与其正常蜂群的表达情况完全相反,同时 *ame-miR-13b* 在年轻采集蜂脑部的表达量与在同日龄哺育蜂脑部的表达量没有显著差异。Ben-Shahar 等(2002)报道,不管在正常蜂群还是在同龄蜂群中,*foraging* 在西方蜜蜂采集蜂脑部的表达量总是显著高于其在哺育蜂脑部的表达量,接着他们利用 RNAi 试验发现该基因调控蜜蜂哺育蜂和采集蜂的行为转变,这也是第一个报道能够调控蜜蜂劳动分工行为的基因。而此前我们检测到,不论在正常蜂群还是同龄蜂群中,*ame-miR-279a* 在哺育蜂脑部的表达量总是高于其在采集蜂脑部的表达量,在蜜蜂脑部蘑菇体内表达丰富,最终发现 *ame-miR-279a* 可能通过调节 *Mblk*-1 影响蜜蜂的糖反应能力,从而参与蜜蜂劳动分工行为的调控(Liu *et al.*, 2017)。而本研究我们发现不论在正常蜂群还是在同龄蜂群中,*ame-miR-31a* 在哺育蜂脑部的表达量总是显著高于其在采集蜂脑部的表达量,这进一步提示我们 *ame-miR-31a* 在蜜蜂行为转变中的作用。

miRNAs 通过与靶基因 mRNA 特异性的碱基互补配对,引起靶基因 mRNA 的降解或者抑制其翻译发挥着多种生物功能。前期我们预测 *Mblk*-1 是 *ame-miR-31a* 的靶基因(Liu *et al.*, 2012)。*Mblk*-1 是蜜蜂蘑菇体组织表达丰富的转录因子,在蜜蜂蘑菇体神经回路中发挥重要的作用(Takeuchi *et al.*, 2001；Park *et al.*, 2002)。有报道 MAPK（mitogen-activiated protein kinase)通路直接调控 *Mblk*-1 影响蜜蜂的记忆行为。而在无脊椎动物和脊椎动物中,MAPK 蛋白参与了不同学习方式形成的长期记忆调控(Park *et al.*, 2003)。前期我们报道 *ame-miR-279a* 可能通过调节 *Mblk*-1 影响蜜蜂的糖反应能力,从而调控蜜蜂的劳动分工行为(Liu *et al.*, 2017)。因此,我们推测 *ame-miR-31a* 可能通过调控靶基因 *Mblk*-1 参与调节蜜蜂行为变化,又或者 *ame-miR-31a* 与 *ame-miR-279a* 共同靶向 *Mblk*-1 调节蜜蜂行为转变。

参考文献（References）

Ashby R, Forêt S, Searle I, Maleszka R, 2016. MicroRNAs in honey bee caste determination. *Sci. Rep.*, 6：18794.

Bartel DP, 2004. MicroRNAs：genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2)：281 –297.

Behura SK, 2007. Insect microRNAs：structure, function and evolution. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 37(1)：3 –9.

Behura SK, Whitfield CW, 2010. Correlated expression patterns of microRNA genes with age-dependent behavioural changes in honeybee. *Insect Mol. Biol.*, 19(4)：431 –439.

Ben-Shahar Y, Robichon A, Sokolowski MB, Robinson GE, 2002. Influence of gene action across different time scales on behavior. *Science*, 296(5568)：741 –744.

Busto GU, Guven-Ozkan T, Fulga TA, Van Vactor D, Davis RL, 2015. microRNAs that promote or inhibit memory formation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 200(2)：569 –580.

Cristino AS, Barchuk AR, Freitas FC, Narayanan RK, Biergans SD, Zhao Z, Simoes ZLP, Reinhard J, Claudianos C, 2014. Neuroligin-associated microRNA-932 targets actin and regulates memory in the honeybee. *Nat. Commun.*, 5：5529.

Foo LC, Song S, Cohen SM, 2017. miR-31 mutants reveal continuous glial homeostasis in the adult *Drosophila* brain. *EMBO J.*, 36(9)：1215.

Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443

(7114): 931 - 949.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin*-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin*-14. *Cell*, 75(5): 843 - 854.

Liu F, Peng W, Li Z, Li W, Li L, Pan J, Zhang S, Miao Y, Chen S, Su S, 2012. Next-generation small RNA sequencing for microRNAs profiling in *Apis mellifera*: comparison between nurses and foragers. *Insect Mol. Biol.*, 21(3): 297 - 303.

Liu F, Shi TF, Yin W, Su X, Qi L, Huang ZY, Zhang SW, Yu LS, 2017. The microRNA *ame-miR-279a* regulates sucrose responsiveness of forager honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 90: 34 - 42.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402 - 408.

Lourenço AP, Guidugli-Lazzarini KR, Freitas FCP, Bitondi MMG, Simões ZLP, 2013. Bacterial infection activates the immune system response and dysregulates microRNA expression in honey bees. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 43(5): 474 - 482.

Macedo LM, Nunes FM, Freitas FC, Pires CV, Tanaka ED, Martins JR, Piulachs MD, Cristino AS, Pinheiro DG, Simões ZL, 2016. MicroRNA signatures characterizing caste-independent ovarian activity in queen and worker honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insect Mol. Biol.*, 25(3): 216 - 226.

Nunes FMF, Ihle KE, Mutti NS, Simões ZLP, Amdam GV, 2013. The gene *vitellogenin* affects microRNA regulation in honey bee (*Apis mellifera*) fat body and brain. *J. Exp. Biol.*, 216(19): 3724 - 3732.

Olivier V, Massou I, Celle O, Blanchard P, Schurr F, Ribière M, Gauthier M, 2008. *In situ* hybridization assays for localization of the chronic bee paralysis virus in the honey bee (*Apis mellifera*) brain. *J. Virol. Methods*, 153(2): 232 - 237.

Park JM, Kunieda T, Kubo T, 2003. The activity of Mblk-1, a mushroom body-selective transcription factor from the honeybee, is modulated by the Ras/MAPK pathway. *J. Biol. Chem.*, 278(20): 18689 - 18694.

Park JM, Kunieda T, Takeuchi H, Kubo T, 2002. DNA-binding properties of Mblk-1, a putative transcription factor from the honeybee. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 291(1): 23 - 28.

Robinson GE, 1987. Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 20(5): 329 - 338.

Robinson GE, 1992. Regulation of division of labor in insect societies. *Annu. Rev. Entomol.*, 37: 637 - 665.

Shi TF, Liu F, Yu LS, Zong C, Wang TS, 2014a. Expression levels of three miRNAs in the brain of different day-old workers of *Apis mellifera ligustica* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomol. Sin.*, 57(12): 1368 - 1374. [施腾飞, 刘芳, 余林生, 宗超, 汪天澍, 2014a. 意大利蜜蜂不同日龄工蜂脑部三种 miRNA 的表达水平. 昆虫学报, 57(12): 1368 - 1374]

Shi TF, Yu LS, Liu F, Zong C, Wang TS, 2014b. Progress in microRNAs in honey bees. *Acta Entomol. Sin.*, 57(5): 601 - 606. [施腾飞, 余林生, 刘芳, 宗超, 汪天澍, 2014b. 蜜蜂 microRNA 的研究进展. 昆虫学报, 57(5): 601 - 606]

Shi YY, Zheng HJ, Pan QZ, Wang ZL, Zeng ZJ, 2015. Differentially expressed microRNAs between queen and worker larvae of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 46(1): 35 - 45.

Takeuchi H, Kage E, Sawata M, Kamikouchi A, Ohashi K, Ohara M, Fujiyuki T, Kunieda T, Sekimizu K, Natori S, Kubo T, 2001. Identification of a novel gene, *Mblk*-1, that encodes a putative transcription factor expressed preferentially in the large-type Kenyon cells of the honeybee brain. *Insect Mol. Biol.*, 10(5): 487 - 494.

Weaver DB, Anzola JM, Evans JD, Reid JG, Reese JT, Childs KL, Zdobnov EM, Samanta MP, Miller J, Elsik CG, 2007. Computational and transcriptional evidence for microRNAs in the honey bee genome. *Genome Biol.*, 8(6): R97.

Whitfield CW, Cziko AM, Robinson GE, 2003. Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. *Science*, 302(5643): 296 - 299.

(责任编辑: 马丽萍)